

517, 452

(12) 依照专利合作条约所公布国际

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2003年12月24日(24.12.2003)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 03/106999 A1

- (51) 国际分类号⁷: G01N 33/50
- (21) 国际申请号: PCT/CN03/00055
- (22) 国际申请日: 2003年1月22日(22.01.2003)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
02113864.8 2002年6月12日(12.06.2002) CN
02133622.9 2002年8月19日(19.08.2002) CN
02134007.2 2002年11月4日(04.11.2002) CN
02134006.4 2002年11月4日(04.11.2002) CN
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 成都夸常科技有限公司(CHENGDU KUACHANG SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国四川省成都市桐梓林中路1号, Sichuan 610041 (CN).
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 邹方霖(ZOU, Fanglin) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区玉林南路64号1幢4单元12号, Sichuan 610000 (CN)。陈春生(CHEN, Chunsheng) [CN/CN]; 中国四川省成都市龙舟路63号13幢2单元4号, Sichuan 610000 (CN)。王建霞(WANG, Jianxia) [CN/CN]; 中国四川省眉山市纱帽行南段6号3幢2单元2号, Sichuan 610000 (CN)。陈宁(CHEN, Ning) [CN/CN]; 中国四川省攀枝花市东区瓜子坪四村42号附32号, Sichuan 610000 (CN)。
- (74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司北京办事处(NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD., BEIJING OFFICE); 中国北京市金融大街27号投资广场A座10层, Beijing 100032 (CN)。
- (81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: BIOCHIP WITH MAXIMIZATION OF THE REACTOR NUMBER

(54) 发明名称: 一种反应器数目最大化的生物芯片

(57) Abstract: A biochip mainly comprises one or more shaping plates and substrates or substrates conjugated with probes. The maximization of the reactor number of the biochip can be achieved by the minimization of occupying area of the reactor isolating structures on the substrates, the minimization of occupying area of other structures except the reactors on the substrates and/or the maximization of effective area of the substrates. It is characterized in that the isolating structures between the reactors can be surface isolation, surface hydrophobic isolation or height difference isolation based on isolating height.

(57) 摘要

本发明涉及一种生物芯片, 其主要包括一个或多个成型板和基片或者结合有探针的基片, 其中反应器数目的最大化是通过反应器隔离结构占用基片面积最小化、反应器之外的其它结构占用基片面积最小化和/或基片有效面积最大化来实现的, 其特征在于反应器之间的隔离结构为表面隔离、表面疏水性隔离或以隔离高度为基础的高度差隔离。

WO 03/106999 A1

一种反应器数目最大化的生物芯片

技术领域

本发明涉及一种反应器数目最大化的生物芯片，其中通过使基片有效面积最大化、使反应器隔离结构占用基片面积最小化或者减少甚至去除反应器之外的其它结构占用基片面积，从而使反应器占用的平均基片面积最小化，达到降低多反应器生物芯片单位反应器成本和提高生物芯片使用效率的目的。

背景技术

生物芯片，在本发明中也简称芯片，是一种定性和 / 或定量的检测产品，其原理是将微量探针以可寻址的方式固定在固相载体表面上，使其在检测条件下与生物样品中的目标分子发生特异反应，然后再对特异反应的结果进行识别。

目前最常用的生物芯片是多肽芯片和基因芯片。多肽芯片是以多个氨基酸的序列结构（包括蛋白质）作为探针固定在基片上制备的生物芯片。基因芯片是用待检标本中核酸、核苷酸与互补核酸、核苷酸探针杂交，形成杂交体，或与特异性抗体结合，再用呈色反应显示检测结果的芯片。

生物芯片有着广泛的应用范围，包括基因表达检测、基因筛选、药物筛选、疾病诊断治疗、环境监测和治理、司法鉴定等领域。

生物芯片的核心是其上的反应器。本发明中的生物芯片的反应器，是指生物芯片中固定有探针阵列，在检测时与目标物发生特异性反应的场所及与其连通的其它相关结构。本发明中的生物芯片的探针，包括所有可以以可寻址的方式固定在固相载体上的具有生物活性的物质，包括DNA、多肽、蛋白质、细胞、组织等生物成分。在本发明中，基片是指生物芯片中用作固相载体固定探针阵列的部件；探针板是指固定有探针阵列的基片。在本发明中，按照生物芯片上反应器的数目 n ，生物芯片被定义为单反应器生物芯片（ $n=1$ ）和多反应器生物芯片（ n 等于或大于2）。

本发明中，按照检测过程中所加入的液相介质能否在反应器中定向流动，反应器被定义为流动反应器和非流动反应器；以流动反应器和非流动反应器为特征的生物芯片被分别定义为流动生物芯片和非流动生物芯片。

本发明中，按照反应器探针阵列上方在整个检测过程中是否开放，将反应器分别定义为开放式和非开放式反应器；以此反应器为特征的生物芯片，被分别定义为开放式和非开放式生物芯片。

生物芯片反应器通常同时具有上述几种反应器的性质。本发明中，这些反应器被定义为以其所具有的全部性质为共同特征的反应器，以此反应器为特征的生物芯片也被同样地定义。例如，如果在检测过程中探针阵列上方为无覆盖物的开放结构，则所加入的液相介质能在反应器中定向流动，则该反应器被定义为开放式流动反应器，相应的生物芯片被定义为开放式流动生物芯片，或简称开放式流动芯片；其它以次类推。

生物芯片的现状如下：

1、非流动生物芯片

非流动生物芯片包括非开放式非流动生物芯片和开放式非流动生物芯片，目前最广泛使用的是开放式非流动芯片。

目前的开放式非流动芯片是单反应器开放式非流动芯片，一个例子是以显微镜载玻片为基础，经活化、点样制成、无其它新增结构的芯片。其优点是结构简单，点样和扫描操作均简便易行，部分操作还可在外力推动下的介质流动状态下进行（例如喷液清洗）。此种芯片的缺点是当探针种类较少、探针阵列较小时，例如肽芯片或蛋白质芯片的情况，由于一个反应器只需固定数量不多的探针（例如几个至几百个），单反应器芯片就显得效率太低，加大了生产和检测成本，这种情况下生物芯片的实际应用受到了很大限制。

为了提高效益，生产商和科技工作者对这类芯片进行了很多改进，例如把单开放式非流动芯片发展为多开放式非流动芯片。目前市场上的多开放式非流动反应器芯片的基本结构为：在一块尺寸为25 mm×75 mm或26 mm×75 mm（宽×高）的标准基片上以高度小于1.0 mm的隔离区形成几到

几十个圆形或方型的开放式反应器。此一开放式反应器有加液区和反应区，但无出液区。检测时，由于无出液区，反应介质不可以被置于定向流动状态，因而不能进行连续操作，芯片效率仍待进一步提高。此外，也是由于无出液区，开放式反应器隔离区如太低会出现相邻反应器之间的交叉污染，如其太高又不能利用目前使用比较普遍的芯片扫描仪进行阅读。针对这一问题，我们发明了《一种可装拆使用的生物芯片》（专利申请号02113540.1），在检测时，装上一足够高的反应器隔离装置以防交叉污染，扫描时拆掉隔离装置以适应扫描仪要求。目前的开放式多反应器生物芯片，除可拆装使用的生物芯片外，虽然也考虑了在同一基片上形成多个反应器，但并未深入考虑基片上形成最大数目的反应器，一个例子是反应器以外的其它功能区（例如手持位置）占用较大量的基片面积，往往高达30%以上。

非开放式非流动多反应器生物芯片的另一个例子是《多样品微阵列生物芯片》（专利申请号01112783.X）。其探针阵列，固定在一个不反应时为开放式、反应时为没有进出口的密闭反应器中。这种芯片在加样后使用聚酯薄膜单面胶材密闭原来开放的反应器，出样、洗涤前需撕除密闭材料，然后加样、再密闭、反应、再去除密闭，如此反复至检测反应完成，操作非常复杂。这种芯片不包含在本发明中的特征芯片中。

2、流动生物芯片

目前的流动生物芯片仅有非开放式流动生物芯片例子包括毛细管生物芯片装置（公告号为CN 2583395Y）和微通道（microchannel）生物芯片。微通道芯片是在芯片片基上制成通常尺寸为：宽度小于0.05mm，深度小于0.025 mm的微通道，再将探针固定于微通道中，然后加入样品并使其流过微通道的探针区，最后采用相应的信号检测系统读取反应结果。微通道生物芯片的一个例子是Caliper Technologies Inc.公司（www.caliper.com）的检测用生物芯片，该芯片用玻片作基片，采用光刻和蚀刻技术在基片上刻蚀出微通道，将探针固定于微通道中。芯片上有多个开放的储液池，储液池由微通道进行连接。微通道芯片的优点是灵敏度高、速度快。其缺点是：1），

生产过程中需先刻蚀出微通道，点上探针，然后再进行微通道密封制作，其构造复杂，工业化生产难度非常大；2)，检测时液体流速需用专门精密设备控制，例如电渗透装置，等；3)，反应完成后，由于固定的探针分子在其内表面，对于某些检测例如荧光标记物检测，不能直接使用普通芯片扫描仪读取结果。

一个例子是在一块载玻片（基片）顶面上固定很多个加有捕捉分子的微小聚乙烯酰胺凝胶条构成的"芯片"，每个凝胶条可用于靶DNA、RNA和蛋白质的分析。

目前的非开放式流动生物芯片尚未考虑反应器数目最大化这一问题。

总之，目前所有的生物芯片主要均以反应器中的单位面积探针数目最大化为发展目标，即在一块基片上固定尽可能多的探针，检测尽可能多的目标分子为目的。现已经达到每平方厘米几千至数万个探针，并且还在继续向更高密度发展。相应配套的点样机、扫描仪也是据此目的而设计制造的。尽管上述各种生物芯片各有很多优点，但每个反应器在基片固定探针的面上所占平均面积大，均只在固相载体基片的一个表面上固定有探针。在检测样品中目标物种类不多，例如小于100种，从而每个反应器中固定的探针种类不多的情况下，通常决定芯片成本的正是每个反应器在基片固定探针的面上所占平均面积。对这类芯片而言，反应器数目最大化尚是一个待解决的问题。

发明内容

因此，本发明提供一种生物芯片，其主要包括一个或多个成型板和基片或者结合有探针的基片，其中反应器数目的最大化是通过反应器隔离结构占用基片面积最小化、反应器之外的其它结构占用基片面积最小化和/或基片有效面积最大化来实现的，其特征在于反应器之间的隔离结构为表面隔离、表面疏水性隔离或以隔离高度为基础的高度差隔离。

在根据本发明的生物芯片中，成型板和基片一起形成一个或多个封闭式流动反应器，并且该封闭式流动反应器有进口和出口。在该生物芯片中，

成型板与基片的接合是不可逆或可逆性的；所述可逆性接合是由以重力、弹力、螺钉或夹具提供的机械力、磁铁或电磁铁提供的磁力、胶粘剂提供的可解粘粘接力之一种或一种以上的作用为基础来实现；而且在需要去除反应器顶面或/和减小反应器高度时，可解除所述可逆性密封连接或以机械去除部分或全部不可逆接合的成型板。

另一方面，在根据本发明的生物芯片中，反应器的隔离部分处为凹面结构。该凹面结构上包含有下列一种或一种以上的控制反应介质流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。

再一方面，在根据本发明的生物芯片中，成型板与基片之间通过粘合连接形成多个开放式反应器，而且各反应器之间的隔离结构的高度大于0.7 mm（多反应器芯片）。在此，隔离结构的高度在需要时可通过解除粘合连接或机械作用来减小或去除，而所述解除粘合连接是通过水或/和有机溶剂的溶胀、溶解的物理化学作用、超声波的物理作用和机械力作用之一的单独作用或一种以上的共同作用实现的，并且所述机械作用包括磨、切、削之一或它们的组合。

另一方面，在根据本发明的生物芯片中，成型板和基片一起形成多个开放式反应器，各成型板中反应器隔离结构的高度小于1 mm但疏水性高于基片的疏水性；且反应器中有专门的出液区（多反应器芯片）。

在根据本发明的多反应器生物芯片中，当基片上形成二列或更多列的反应器时，则基片宽度小于20 mm，而当其基片上只形成一列反应器时，则基片宽度小于9 mm，此时反应器的形状为条形。

在根据本发明的多反应器生物芯片中，反应器隔离结构的高度高于芯片上的部分或全部其它结构，所述其它结构包括与基片探针面位于同一平面的扫描基准面。

在根据本发明的多反应器生物芯片中，芯片的面积大于基片的面积；反应器的部分或全部加液结构或/和出液结构设于成型板超出基片的区域内。

在根据本发明的多反应器生物芯片，其特征在于：反应器的加液区和/或出液区中包含有下列一种或一种以上的控制反应介质定向流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。

在根据本发明的生物芯片中，亲水材料包括硅、铝化合物等无机亲水材料、聚丙烯酰胺类化合物等有机亲水材料、各种亲水涂料、天然高分子亲水材料及其衍生物；所述疏水材料包括各种疏水性有机化合物材料；所述吸水物质包括各类有亲水表面的毛细管、纸类、膜类、含纤维或/和亲水无机化合物的固相多孔物质。

另一个方面，本发明提供的生物芯片是探针固定在基片的顶面和底面的双面生物芯片，其中所述生物芯片的顶面和底面上的结构是对称的或不对称的。在该芯片中，所述基片的厚度大于 1.0 ± 0.1 mm。

在根据本发明的生物芯片中，基片的材料包括所有可以以较小的平均面积形成生物芯片反应器的材料，例如无机材料如玻璃、硅和硅化合物等，聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、尼龙及硝酸纤维素等有机高分子聚合物，以及表面覆盖有金、银等金属、金属化合物的有机材料。

根据本发明的再一个方面，其提供一种组合式生物芯片，该芯片由多个如上所述的生物芯片组成，各生物芯片之间通过嵌合、粘合、机械定位方法互相接合；总宽度大于或等于25 mm；而且在检测中可以根据需要改变其所组合的芯片或探针板数目。

附图说明

图 1A 是根据本发明以表面隔离为基础的封闭式流动生物芯片的俯视图，图 1B 是图 1A 所示生物芯片中成型板的仰视图，图 1C 是本发明封闭式流动生物芯片中基片上形成的探针阵列的示意图，图 1D 是沿图 1A 中 a—a 线的截面图，而图 1E 是沿图 1A 中 b—b 线的截面图，

图 2 是说明磁力固定夹具固定图 1A 所示的成型板和图 1C 所示基片时的示意图，

图 3A 是根据本发明隔离部分为凹面结构的生物芯片的立体图，图 3B 是图 3A 所示生物芯片的横截面图，而图 3C 是在凹面结构中含有吸水层的生物芯片的横截面图，

图 4A 是根据本发明以隔离高度为基础的生物芯片的俯视图，图 4B 是沿图 4A 中 a—a 线的截面图，而图 4C 是说明图 4B 生物芯片的隔离高度降低后的图，

图 5A 是根据本发明隔离结构的疏水性高于基片疏水性的生物芯片的俯视图，图 5B 是沿图 5A 中 a—a 线的截面图，而图 5C 是说明图 5A 中不同形状的反应器出液区的示意图，

图 6A 是说明图 4 以及图 5 所示生物芯片中反应器为其他形状时的示意图，而图 6B 显示了反应器的可能形状，

图 7A—C 是说明反应器结构与基片之间关系的示意图，

图 8A 是根据本发明的双面生物芯片的剖面图，而图 8B 是说明双面生物芯片之基片两个表面上的探针阵列的示意图，

图 9 是说明用机械力可逆密封夹具固定的根据本发明的双面生物芯片的示意图，以及

图 10A 是将根据本发明的一种可逆粘合密封的双面生物芯片直立后的俯视图，图 10B 是图 10A 所示双面生物芯片的侧视图，而图 10C 是图 10A 所示双面生物芯片的仰视图。

具体实施方式

我们在研制输血检测芯片的过程中，为了让研制的芯片除了有更好的质量，而且在价格上也要比目前通用的 Elisa 试剂盒更有竞争力，于是深深地感觉到提高此类生物芯片中的成本控制因素之一的基片的使用效率是解决问题的关键。因此，把“反应器数目最大化”作为一个重要的研究课题，并先后完成了“一种可拆装使用的生物芯片”、“一种包含有封闭式反应器的探针板”、“一种流动生物芯片及其使用方法”、“一种多面生物芯片”、“一种小面积反应器生物芯片”的研究。在这些研究的基础上形成了本发

明的芯片。

本发明是以生物芯片中单位面积基片上反应器的数目最大化为追求目标，即在一块基片上形成尽可能多的反应器，使一个生物芯片能够检测最多的样品数为目的。

在本发明中，术语“反应器”包含探针区、隔离区、有或无加样区的反应池、出液区。探针区是反应器中固定有探针的区域；反应池是加入的样品和探针进行反应的区域；出液区是反应完成后的液体和洗涤液离开反应器的区域；隔离区是在反应器的反应区周围为避免交叉污染而制作的隔离区域；加液区是向反应区加入各种检测所需反应介质的区域，可以是单独的区域，也可以是探针区和出液区或它们的一部分。出液区可以在反应器的一侧，也可以在反应器的除探针区外的其它区域，例如在探针区的两侧、三方乃至四周。出液结构是反应器出液区中包含的控制反应介质定向流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、孔、条。

出液区在探针区一侧的例子是在反应池的一侧开有一条出液槽；出液区在探针区四周的例子是在探针区外四周设计留下空白区域即出液区，当隔离区高于探针区时，液体可通过环形抽吸管排除液体；当隔离区低于探针区时，液体可自动从探针区四周流向出液区。

在出液槽的底部使用亲水材料层可以加快反应池中的液体沿着出液槽方向流出，利于保持反应池的液面高度，避免交叉污染。隔离结构是隔离区防止反应器之间发生交叉污染而设计的阻拦液体非正常流动的反应器的结构。例如在隔离区上的隔离沟、线、槽、隔离区表面的亲水材料层、疏水材料层。在隔离区的表面使用疏水材料层可以阻止异常情况下反应池中的液体从反应池中溢出和溅在隔离区上的液体小点的流动，减少交叉污染的可能性。在隔离区高度低于探针平面时，隔离区的表面使用亲水材料层可以加快反应池和隔离区中的液体流出，减少交叉污染的可能性。

本发明公开了一种生物芯片，其主要包括一个或多个成型板和基片或者结合有探针的基片，其中反应器数目的最大化是通过反应器隔离结构占

用基片面积最小化、反应器之外的其它结构占用基片面积最小化和/或基片有效面积最大化来实现的，其特征在于反应器之间的隔离结构为表面隔离、表面疏水性隔离或以隔离高度为基础的高度差隔离。

本发明所述表面隔离包括以探针平面为反应池底面的反应器的反应池顶面被隔离区的隔离面密封形成的隔离以及以基片本身作为隔离面的隔离（如根据本发明的双面生物芯片），表面疏水性隔离是指反应器的探针平面与隔离区的隔离面由于隔离面使用疏水材料而形成的隔离，而高度差隔离是指反应器的探针平面与隔离区的隔离面中断形成的高度差异而实现的隔离。

为在避免反应器之间交叉污染的条件下减小反应器隔离结构占有基片面积，从而减小生物芯片每个反应器所占用的探针板上固定探针的一面的面积的平均值，本发明中的生物芯片，首先是以顶面隔离为特征隔离机制的封闭式流动生物芯片。根据该实施方案的封闭式流动生物芯片，是由成型板和基片一起形成多个封闭式流动反应器，并且该封闭式流动反应器有进口和出口。

图1A是根据本发明以表面隔离为基础的封闭式流动生物芯片中成型板的俯视图，图1B是图1A所示成型板的仰视图，图1C是本发明封闭式流动生物芯片中基片上形成的探针阵列的示意图，图1D是沿图1A中a-a线的截面图，而图1E是沿图1A中b-b线的截面图。如图1A和1B所示，在成型板2上形成有多个对应于图1C之基片1上的探针阵列的反应器腔室5，每个反应器腔室5都有作为进口的加液口3和作为出口的出液口4。将基片1与成型板粘合在一起，并再于其上覆盖一层基片进行密封（例如在图1A的a-a与b-b线之间），就可形成根据本发明的封闭式生物芯片。根据本发明的生物芯片由于具有顶面隔离，可以避免各个反应器之间的交叉污染。其另外一个优点是，由于具有顶面隔离，反应器之间的间隔可尽可能地小，提高了基片的使用率。

本发明的封闭式流动生物芯片，可以是一种可从封闭转为开放的生物芯片。覆盖用基片可通过胶粘剂或其他可逆密封连接而进行固定，在需要

去除反应器顶面或/和减小反应器高度时，可解除所述可逆密封连接或以机械去除。例如，此生物芯片在扫描前为封闭或流动生物芯片，扫描时可按所述方法拆下隔离机构进行近距扫描，其优点是在使用过程中可根据需要进行封闭一开放的转换扩大了分析范围又提高了分析速度，同时在保证质量扫描基础上，实现反应器数目的最大化。连接可以由重力、弹力、螺钉或夹具提供的机械力、磁铁或电磁铁提供的磁力、胶粘剂提供的可解粘粘结力等之一种或一种以上的作用机制为基础来实现。重力非不可逆密封连接是由形成反应器的部件，紧密地压合在探针板上，形成多个独立互不渗透的反应器螺钉提供的机械力非不可逆密封连接，是由形成反应器的部件在螺钉紧力作用下，紧密地压合在芯片板上，形成多个独立互不渗透的反应器。夹具提供的机械力非不可逆密封连接，是由形成反应器的部件在卡头和卡槽之间的卡紧力作用下，紧密地压合在探针板上，形成多个独立互不渗透的反应器所构成的机构。

磁铁或电磁铁提供的磁力非不可逆密封连接，是由形成反应器的部件在磁铁（永磁铁或电磁铁）的磁力作用下，紧密地压合在探针板上，形成多个独立互不渗透的反应器所构成。本发明的封闭式流动生物芯片，可以在其中进行连续的反应和操作，从而是一种高效的探针板。

图2示出了通过磁力固定装置固定本发明之封闭式流动生物芯片的示意图，其中该磁力固定装置（或夹具）由电磁铁7和含铁磁性板6组成，该含铁磁性板6具有与成型板2的出液口一致的开口，基片1和成型板2被夹在电磁铁7和含铁磁性板6之间，定位于定位模口8处，由此被可逆性地固定。在需要进行检测时，可解除磁力固定，不影响检测精度，而且该夹具还可重复使用。

为在有高度限制条件下避免反应器之间交叉污染以减小反应器隔离结构占有基片面积，本发明中的生物芯片，可以是以凸凹结构为基础的高度差隔离为特征隔离机制的开放式生物芯片，其特征在于：各反应器之间的隔离部分处为凹面结构。

如图3A和3B所示，将一个或者多个结合有探针阵列的基片11固定在成

型板12上，由此形成根据上述实施方案的生物芯片。

本发明的以凸凹结构为基础的多探针板生物芯片，其凹面结构上可包含有下列一种或一种以上的控制反应介质流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。所述亲水材料包括硅、铝化合物等无机亲水材料、聚丙烯酰胺类化合物等有机亲水材料、各种亲水涂料、天然高分子亲水材料及其衍生物；所述疏水材料包括各种疏水性有机化合物材料；所述吸水物质包括各类有亲水表面的毛细管、纸类、膜类、含纤维或/和亲水无机化合物的固相多孔物质。如图3C所示，在各基片11之间，也就是在凹面结构上的控制反应介质流动速度的结构为吸水层13。

为在检测反应部分步骤对反应器有高度限制的条件下避免反应器之间交叉污染以减小反应器隔离结构占有基片面积，从而减小生物芯片每个反应器所占用的基片的面积的平均值，本发明中的生物芯片，可以是以隔离高度为基础的高度差隔离。根据此方面的生物芯片的特征在于，成型板与基片之间通过粘合连接形成多个开放式反应器，而且反应器的隔离结构的高度大于0.7 mm，优选大于1 mm。如图4A和4B所示，基片21和成型板22粘合在一起，形成反应池23和隔离区24。由成型板22形成的隔离高度大于0.7 mm，超过目前常规的生物芯片的隔离高度。

所述隔离结构的高度在使用时根据需要通过解除粘合连接或机械作用来减小或去除。所述胶粘连接可通过水或/和有机溶剂的溶胀、溶解的物理化学作用、超声波的物理作用和机械力作用之一种或一种以上的机制共同作用可解粘。所述有机溶剂优选为乙醇。或者，如图4C所示，可通过磨、切、削等之一种或一种以上的机械作用来减小或去除反应器高度。

为在有高度限制条件下避免反应器之间交叉污染，以减小反应器隔离结构占有基片面积，本发明中的生物芯片，可以是以表面疏水性为特征隔离机制的开放式生物芯片，其特征在于：成型板和基片一起形成多个开放式反应器，各成型板中反应器隔离结构的高度小于1 mm但疏水性高于基片的疏水性；且反应器中有专门的出液区。如图5A和5B所示，成型板32在基

片31上形成多个反应器33。由于成型板32的疏水性高于基片31的疏水性，在表面张力的作用下，可以更大程度地避免各反应器之间的交叉污染。另外，如图5C所示，各反应器都包括各种出液区。

在图4和5所示的生物芯片中，当基片上形成二列或更多列的反应器时，则基片宽度小于20 mm，而当其基片上只形成一列反应器时，则基片宽度小于9 mm。此时，如图6所示，反应器可为长方形、圆形、或条形等。

在图4和5所示的生物芯片中，反应器隔离结构在芯片上的高度，不仅可高于固定有探针的基片，而且可高于芯片上的部分或全部其它结构，所述其它结构中可包含有与基片探针面位于同一平面的扫描基准面（成型板面，如图7A所示）。

在图4和5所示的生物芯片中，芯片面积大于基片的面积；反应器的部分或全部加液结构或/和出液结构设于成型板超出基片的区域内。

如图7A所示，基片41位于成型板42上，两侧为扫描基准面43。如图7B和7C所示，反应器包括反应池44、出液沟45、隔离沟46和隔离区47，其中出液沟45和隔离沟46都是形成于成型板42上，超出了基片41的区域。

在如图4和5所示的开放式生物芯片中，其反应器出液区中可包含有下列一种或一种以上的控制反应介质定向流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。所述亲水材料可包括硅、铝化合物等无机亲水材料、聚丙烯酰胺类化合物等有机亲水材料、各种亲水涂料、天然高分子亲水材料及其衍生物；所述疏水材料可包括各种疏水性有机化合物材料；所述吸水物质可包括各类有亲水表面的毛细管、纸类、膜类、含纤维或/和亲水无机化合物的固相多孔物质。

根据本发明的生物芯片，其是探针固定在基片的顶面和底面的双面生物芯片，所述生物芯片的顶面和底面上的结构是对称的或不对称的。本发明双面生物芯片所含双面探针板的顶面和底面上，可分别固定一个或一个以上的多个探针阵列，并与相应结构一起形成一个或一个以上的多个开放式反应器或非开放式反应器，流动反应器或非流动反应器。

图 8A 是根据本发明的双面生物芯片的剖面图，而图 8B 是说明双面生物芯片之基片两个表面上的探针阵列的示意图。图 9 是说明用机械力可逆密封夹具固定的根据本发明的双面生物芯片的示意图。如图 8A 所示，本发明的双面生物芯片由两块成型板 52 和基片 51 通过粘合基组合在一起，在该基片 51 的两个表面都结合有探针阵列（如图 8B 所示）。如图 9 所示，由两个成型板 52 以及基片 51 形成夹心结构，然后用两个夹板 53 于定位模口 54 处固定上述夹心结构。该固定装置除如上所述的机械力可逆密封夹具外，也可为相对应的磁力固定装置（如图 2）。

本发明双面生物芯片的顶面和底面上的结构可以是对称的或不对称的，位于任一面上的反应器在其对面的投影与该面上的反应器重合、部分重合或不重合，其所含的任一反应器的结构全都在同一面，或不全在同一面。如图 8A 所示，由基片 51 和成型板 52 形成的反应器是不重合的。

本发明的双面生物芯片，其基片的厚度可大于 1.0 ± 0.1 mm。

本发明的双面生物芯片，其多反应器面上反应器间的隔离，可以采用本发明中如上所述的隔离机制，也可以采用其它隔离机制。

如图 10A—C 所示，基片 61 和两块成型板 62 形成本发明的双面生物芯片，在基片 61 上形成多个反应器 65。检测样品时，可该双面芯片直立起来，由加液口 63 加入介质，在重力的作用下，从反应器 65 中通过并直接由出液口 64 流出，可以非常方便地进行检测操作。

本发明还包括本发明生物芯片的一种组合式生物芯片，其特征在于：是由多个如上所述的根据本发明的生物芯片组成，各生物芯片之间通过嵌合、粘合、机械定位方法互相接合；总宽度大于或等于 25 mm；而且在检测中可以根据需要改变其所组合的芯片或探针板数目。

本发明的生物芯片，其基片的材料包括所有可以以较小的平均面积形成生物芯片反应器的材料：无机材料如玻璃、硅和硅化合物等，聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、尼龙及硝酸纤维素等有机高分子聚合物，以及表面覆盖有金、银等金属、金属化合物的有机材料。

本发明生物芯片的优点是：在所需固定的探针数目不大时，通过最大

化地提高基片单位面积上的反应器数目，降低每个样品的检测芯片成本。

实施例

本发明所有的生物芯片基片，为市场上可获得的基片或法国SEDAC公司的实验用基片，包括实施例中使用的基片。

实施例1：磁力可逆封闭式流动生物芯片

本例中的生物芯片的基本结构如图1和图2所示。生物芯片的弹性成型板2由厚度为1 cm的含铁塑料板制成，其如图1B所示开有八个反应器腔室5，每个反应器腔室5上方各有可与加样枪加样管紧密接触的加液口3和可插入引液管的出液口4。基片1上形成有相应于反应器腔室5的探针阵列。此外，其接触基片的一面上还贴有一层厚度为0.5 mm、不覆盖反应腔室的橡胶密封垫。基片1下方为电磁铁7，成型板2的上方为含铁磁性板6，并由电磁铁7和含铁磁性板6组成磁力固定装置。该磁力固定装置与成型板2之间有固定基片1的定位模口8。基片1上根据成型板2腔室的位置预先固定有可形成八个反应器的探针（位置如图1C所示），探针为HCV抗原、HIV₁₊₂抗原和梅毒抗原。每种探针点3个点，形成一个3×3探针阵列。将成型板2、固定有探针的基片1和磁力固定装置定位后，开动电磁铁开关使成型板2与基片1形成密封，然后进行加样，加洗涤液，加标记物，洗涤的操作。在进行扫描前，关掉磁铁开关，从而使成型板2与基片1之间的密封联结去除，取出基片1进行扫描。

在本实施例中，1号样为HCV抗体阳性血清，2号样为HIV₁₊₂抗体阳性人血清，3号样为梅毒抗体阳性人血清，4号样为阳性对照物（HCV抗体，HIV₁₊₂抗体和梅毒抗体阳性血清对照物的混合物），5号样品为阴性对照物（HCV抗体，HIV₁₊₂抗体和梅毒抗体阴性血清对照物的混合物）。所有的样品，均是经使用经典的单反应器开放式芯片在同等反应条件下预先检测确定的。实验结果如表1。

表1 磁力可逆封闭或流动生物芯片的检测结果

样品	HCV抗体	HIV1+2抗体	梅毒抗体
1号	+	—	—
2号	—	+	—
3号	—	—	+
4号	+	+	+
5号	—	—	—
空白	—	—	—

实施例2：含凹面隔离结构的开放式生物芯片

本例中生物芯片的基本结构如图3所示。每一个基片11的尺寸为 $5.0 \times 5.0 \times 1.0$ mm（长 \times 宽 \times 高）。成型板12为塑料板，尺寸为 $75 \times 25 \times 0.5$ mm（长 \times 宽 \times 高）。在成型板12上粘合2行8列共16个基片11，行间距为5 mm，列间距为4 mm。然后在每个基片11上按 3×3 的点阵固定有与实施例1相同的探针。在使用前，将预先开有与芯片中基片尺寸及其分布相应方孔的厚度为0.5 mm的滤纸作为吸水层13套在芯片上，形成以滤纸为控速结构的含凹面隔离结构的开放式生物芯片（图3C）。反应介质直接加在基片11上方，当加入足够量时，介质流入凹面结构中的滤纸上，滤纸将液体向外输运，经机械抽送或更多的吸水物移离芯片。在扫描前再将滤纸移走，并洗涤、吹干芯片。使用实施例1的人血清样品，利用本实施例中的生物芯片，在扫描仪送样杆高度降低0.5 mm的条件下，得到与实施例1相同的结果。

实施例3：粘结—机械减高开放式生物芯片

本例中生物芯片的基本结构如图4所示。成型板22外型尺寸为 $75 \times 25 \times 7$ mm（长 \times 宽 \times 高）。其上开有二行8列共计16个圆孔，每个孔的直径为5 mm。所用探针如实施例1中的探针。将已固定探针的基片21粘合到成型板22上备用。本实施例中所用人血清样品同实施例1。用移液器加入血清样品后，

所制备的芯片用通常的Elisa洗板机加洗液洗涤并抽干。然后加罗丹明标记的羊抗人抗抗体，用洗板机再抽干，加洗液洗涤，抽干。然后用切割器将成型板22削去（如图4B和4C所示），使残留在基片上的高度小于0.5 mm再分别先后用蒸馏水，酒精冲洗，再吹干，然后用扫描仪分析反应结果，所得结果与例一中的结果相同。

实施例4：疏水性隔离的开放式生物芯片

本例中生物芯片的基本结构如图5所示。

基片31的尺寸为75.0×12.5×1.0 mm（长×宽×高），成型板32外型尺寸为75.0×25.0×1.6 mm（长×宽×高），底面中部开有长75.0、宽12.8 mm、深1.0 mm的槽，槽中有二行八列共16个直径为5 mm的圆孔。将基片31与成型板32粘合即形成备用的16孔芯片。本实施例中所用探针如同图1，探针阵列为3×2个，在反应池中央的探针区34尺寸约为1.2×1.0 mm，将探针区以外由成型板圆孔围住的区域作为出液区35（如图5C所示）。芯片用牛血清白蛋白封闭后备用。本实施例中使用一种加液在中心的较高位置而吸液在周围的有同心圆加/吸液结构的Elisa洗板机，吸液的外圆可接触到未固定探针的反应器出液区。本实施例中检测的人血清样品和检测方法如同实施例3，检测结果亦相同。

实施例5：双面生物芯片

本实施例中两个成型板对基片的密封使用夹具可逆密封，其基本结构如图8A和图9所示。

基片51的尺寸为75×25×1 mm（长×宽×高），其顶面和底面上各粘合有一厚度小于0.5 mm成型板52，成型板52上有二行八列共16个孔，孔径为45 mm，二面上的孔互错开。本实施例中所用探针如图1探针所示，为3×2，先后在两面上的16个孔中固定探针，然后用牛血清白蛋白封闭，干燥后备用。本实施例中使用两个成型板52，每个板上有与待用的基片51上的孔相应的16个孔。夹板53还有定位模口54以准确固定基片51和二面上的成

型板52的位置。将基片51和二面上的成型板52定位后用夹板53将三者间形成的二个面密封，即可使用。本实施例中使用的人血清及检测方法同实施例3。在扫描前只需将夹板53的压力去除，取下基片，清洗吹干后在扫描仪送样杆高度降低0.5 mm的条件下扫描，得到与实施例相同的结果。

权 利 要 求

1、一种生物芯片，其主要包括一个或多个成型板和基片或者结合有探针的基片，其中反应器数目的最大化是通过反应器隔离结构占用基片面积最小化、反应器之外的其它结构占用基片面积最小化和/或基片有效面积最大化来实现的，其特征在于反应器之间的隔离结构为表面隔离、表面疏水性隔离或以隔离高度为基础的高度差隔离。

2、根据权利要求1所述的生物芯片，其中成型板和基片一起形成一个或多个封闭式流动反应器，并且该封闭式流动反应器有进口和出口。

3、根据权利要求2所述的生物芯片，其特征在于：所述成型板与基片的结合是不可逆或可逆性的；所述可逆性结合是由以重力、弹力、螺钉或夹具提供的机械力、磁铁或电磁铁提供的磁力、胶粘剂提供的可解粘粘结力之一种或一种以上的作用为基础来实现；而且在需要去除反应器顶面或/和减小反应器高度时，可解除所述可逆性密封连接或以机械去除部分或全部不可逆结合的成型板。

4、根据权利要求1所述的生物芯片，其特征在于：反应器的隔离部分处为凹面结构。

5、根据权利要求4所述的生物芯片，其特征在于：所述凹面结构上包含有下列一种或一种以上的控制反应介质流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。

6、根据权利要求1所述的生物芯片，其特征在于：成型板与基片之间通过粘合连接形成多个开放式反应器，而且各反应器之间的隔离结构的高度大于0.7 mm。

7、根据权利要求6所述的生物芯片，其特征在于：所述隔离结构的高度大于1.0 mm。

8、根据权利要求6所述的生物芯片，其特征在于：所述隔离结构的高度在需要时可通过解除粘合连接或机械作用来减小或去除，而所述解除粘

合连接是通过水或/和有机溶剂的溶胀、溶解的物理化学作用、超声波的物理作用和机械力作用之一的单独作用或一种以上的共同作用实现的，并且所述机械作用包括磨、切、削之一或它们的组合。

9、根据权利要求1所述的生物芯片，其特征在于：成型板和基片一起形成多个开放式反应器，各成型板中反应器隔离结构的高度小于1 mm但疏水性高于基片的疏水性；且反应器中有专门的出液区。

10、根据权利要求6—8之一所述的生物芯片，其特征在于：当基片上形成二列或更多列的反应器时，则基片宽度小于20 mm，而当其基片上只形成一列反应器时，则基片宽度小于9 mm。

11、根据权利要求6—8之一所述的生物芯片，其特征在于：反应器为条形。

12、根据权利要求6—8之一所述的多反应器生物芯片，其特征在于：反应器隔离结构的高度高于芯片上的部分或全部其它结构。

13、根据权利要求12所述的多反应器生物芯片，其特征在于：所述其它结构包括与基片探针面位于同一平面的扫描基准面。

14、根据权利要求6—8之一所述的生物芯片，其特征在于：芯片面积大于基片的面积；反应器的部分或全部加液结构或/和出液结构设于成型板超出基片的区域内。

15、根据权利要求6—8之一所述的多反应器生物芯片，其特征在于：反应器加液区和/或出液区中包含有下列一种或一种以上的控制反应介质定向流动速度的结构：亲水材料层、疏水材料层、以毛细管现象为基础的吸水材料层及有助于控制流动的导流沟、槽、条。

16、根据权利要求5或15所述的生物芯片，其特征在于：所述亲水材料包括硅、铝化合物等无机亲水材料、聚丙烯酰胺类化合物等有机亲水材料、各种亲水涂料、天然高分子亲水材料及其衍生物；所述疏水材料包括各种疏水性有机化合物材料；所述吸水物质包括各类有亲水表面的毛细管、纸类、膜类、含纤维或/和亲水无机化合物的固相多孔物质。

17、根据权利要求1所述的生物芯片，其是探针固定在基片的顶面和底

面的双面生物芯片，所述生物芯片的顶面和底面上的结构是对称的或不对称的。

18、根据权利要求17所述的生物芯片，其特征在于：所述基片的厚度大于 1.0 ± 0.1 mm。

19、根据权利要求1—18之一所述的生物芯片，其特征在于：基片的材料包括所有可以以较小的平均面积形成生物芯片反应器的材料，例如无机材料如玻璃、硅和硅化合物等，聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、尼龙及硝酸纤维素等有机高分子聚合物，以及表面覆盖有金、银等金属、金属化合物的有机材料。

20、一种组合式生物芯片，其由多个如权利要求1—19之一所述的生物芯片组成，各生物芯片之间通过嵌合、粘合、机械定位方法互相接合；总宽度大于或等于25 mm；而且在检测中可以根据需要改变其所组合的芯片或探针板数目。

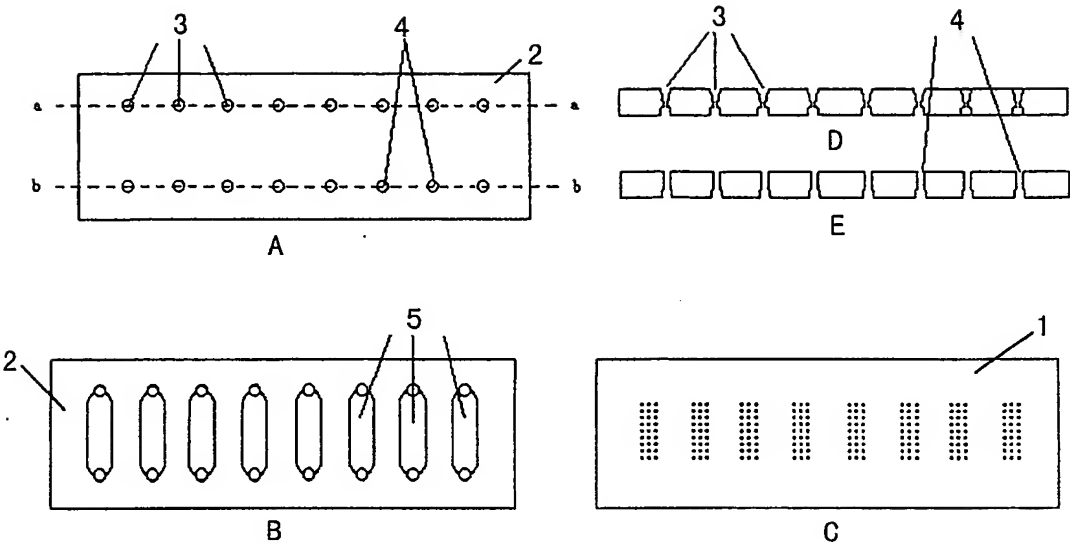


图1

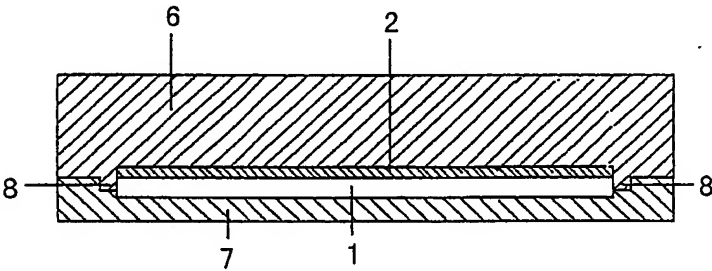


图2

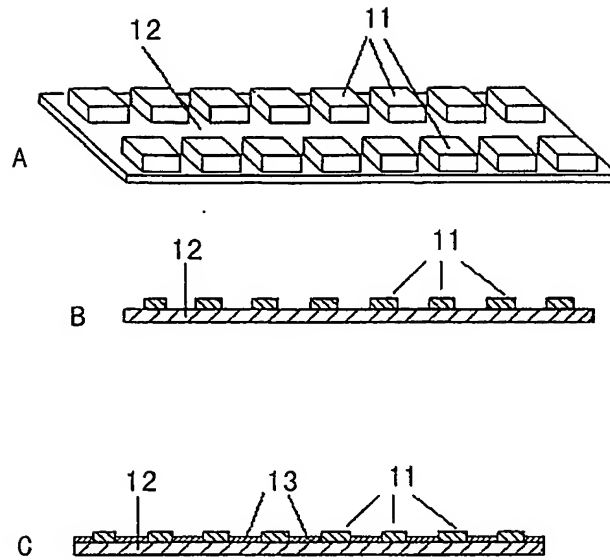


图3

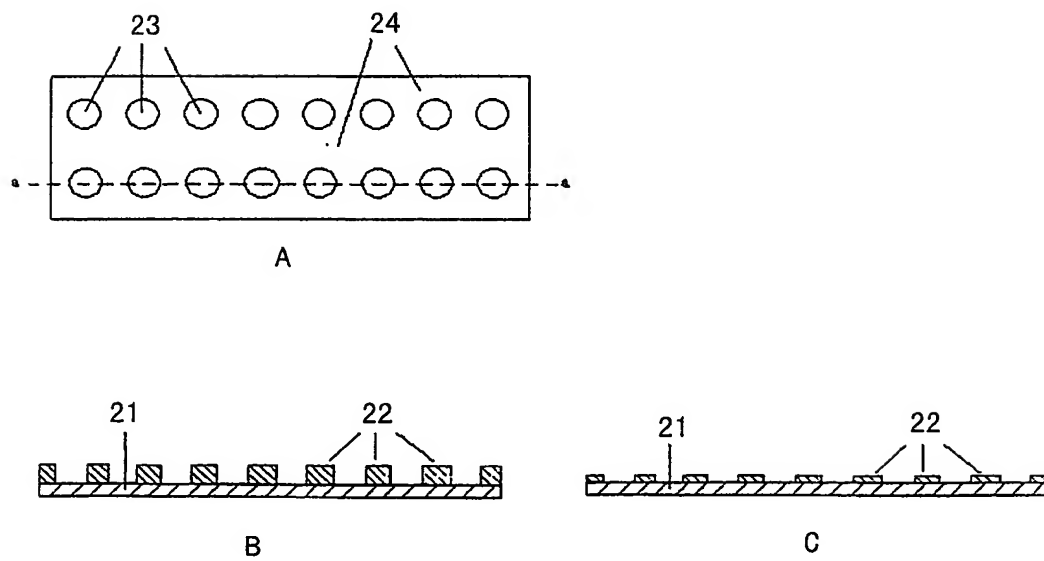


图4

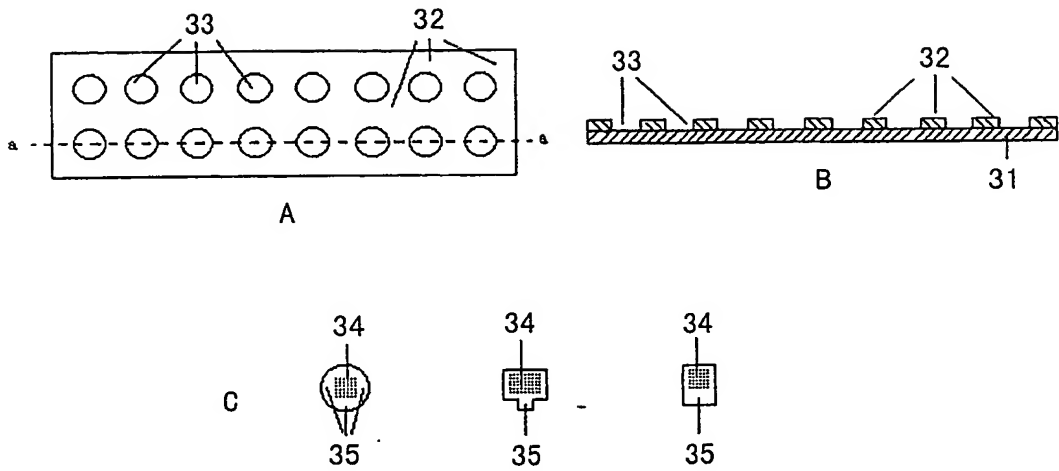


图5

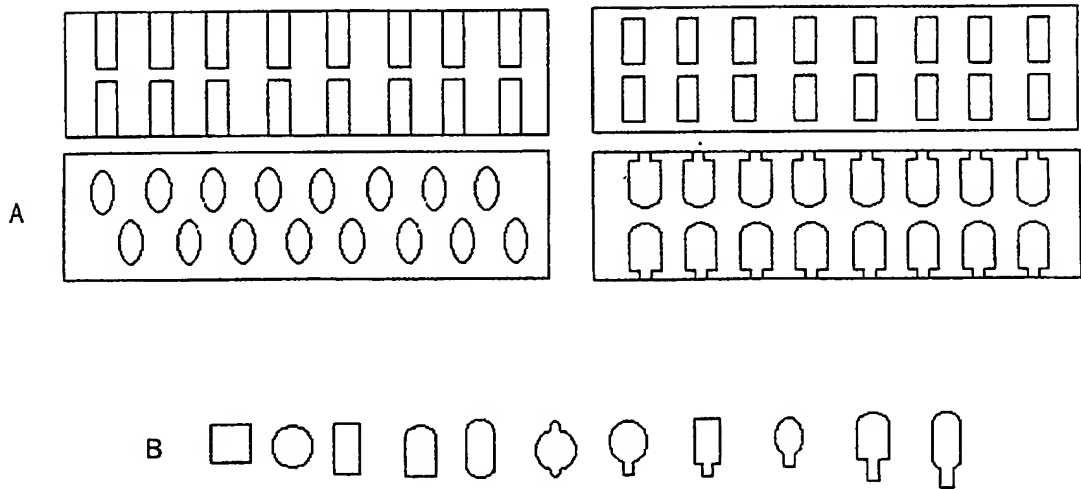


图6

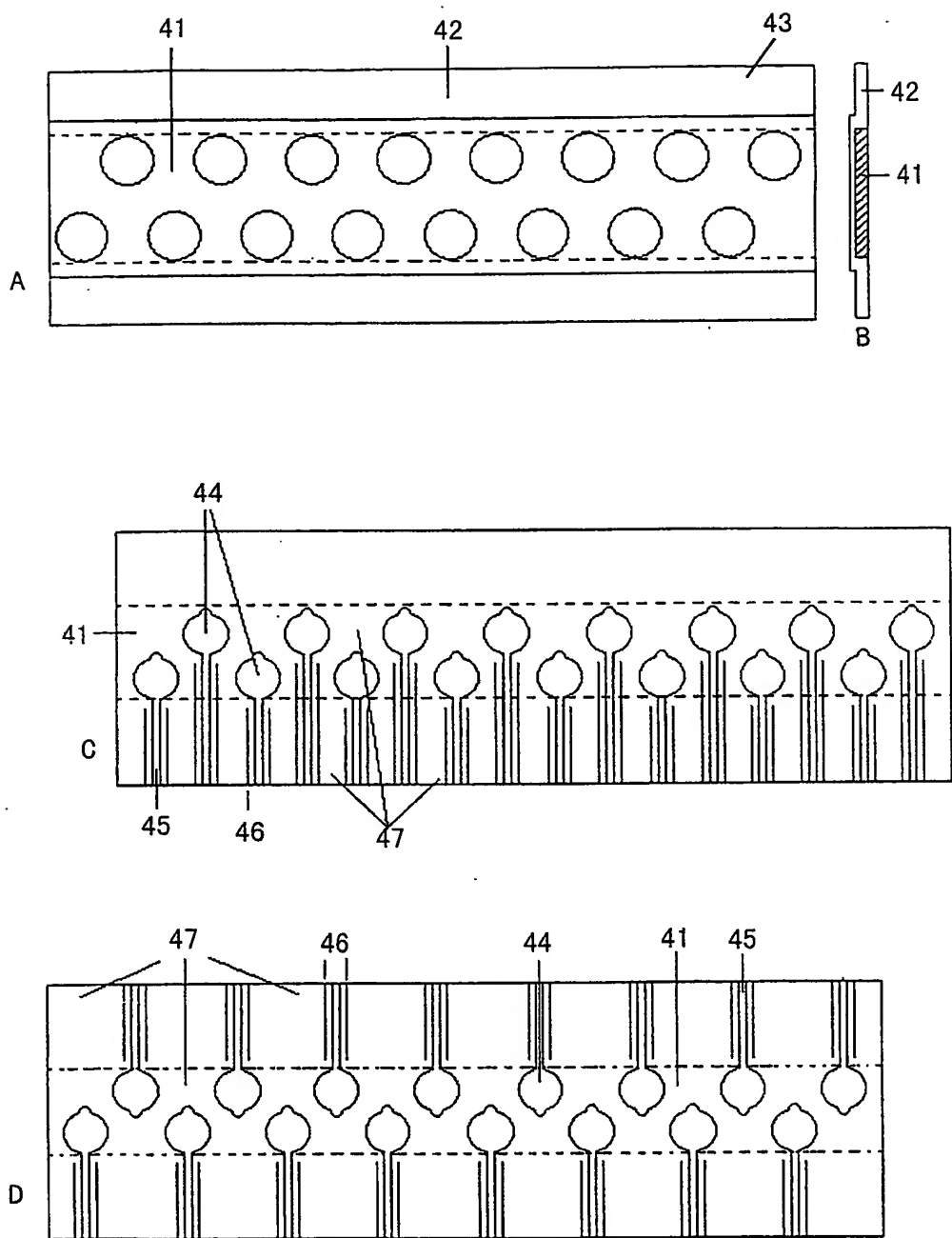


图7

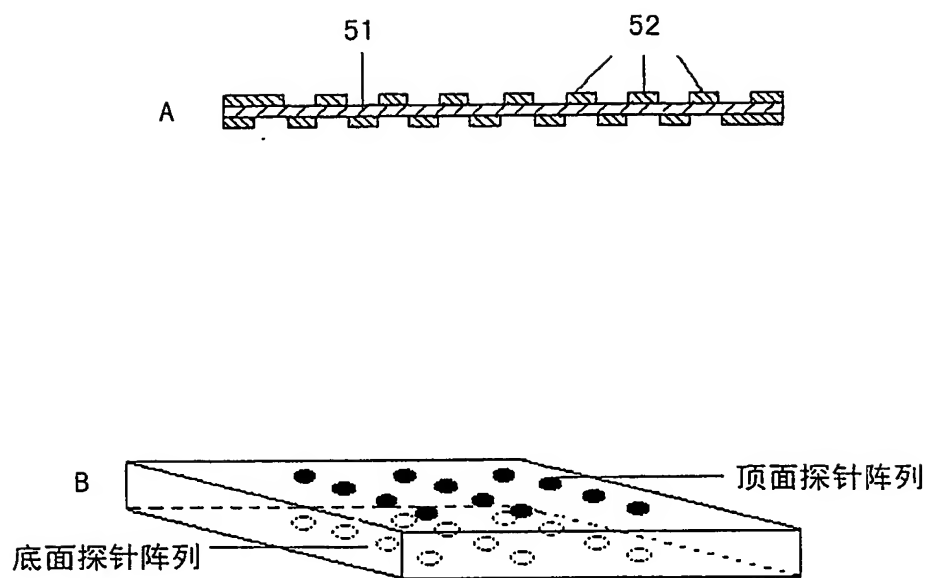


图8

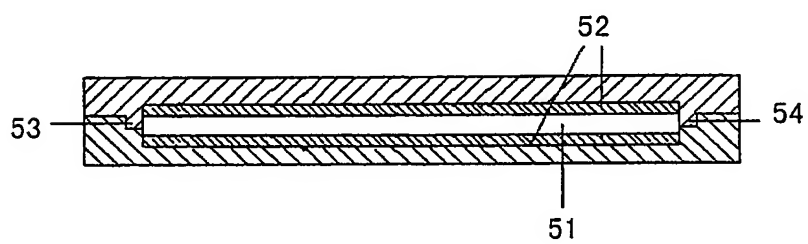


图9

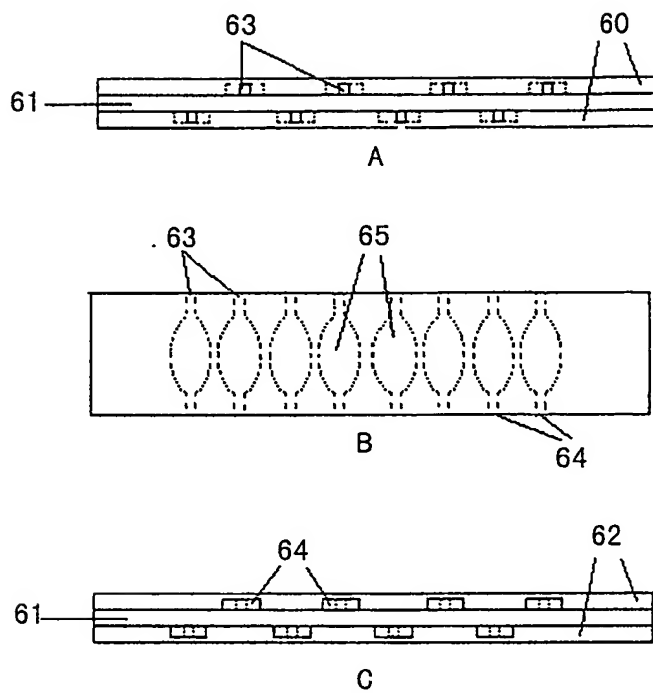


图10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ G01N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Document (1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPOCOD, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN, Y, 2386439(HE, YUENONG) 05. July 2000(05.07.00), entire document	1-20
A	CN, A, 1335501(SHANGHAI JINGTAI BIOTECHNICAL CO., LTD.) 13. February 2002(13.02.02), entire document	1-20
A	CN, Y, 2473211(XU, RONGZHEN), 23. January 2002(23.01.02), entire document	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05. April 2003(05.04.03)	Date of mailing of the international search report 08 MAY 2003 (08.05.03)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Telephone No. 86-10-62093916 印王 章奕 Wang, Yi

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00055

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO ,A, 0163241(ZYOMYX) 30. August 2001(30.08.01), entire document	1-20
A	WO, A, 0167065(GENOMIC S. A.) 13.September 2001(13.09.01), entire document	1-20
A	WO, A, 0138865(THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA) 31. May 2001(31.05.01), entire document	1-20


International application No.
PCT/CN03/00055

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/00055

A. 主题的分类		
IPC ⁷ G01N33/50		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)		
IPC ⁷ G01N, C12Q		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
中国专利文献 (1985~)		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)		
WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN, Y, 2386439(何农跃) 05.7 月 2000(05.07.00), 全文	1-20
A	CN, A, 1335501(上海晶泰生物技术有限公司) 13.2 月 2002(13.02.02), 全文	1-20
A	CN, Y, 2473211(徐荣臻) 23.1 月 2002(23.01.02), 全文	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: “A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 “L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 “X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 “&” 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 05.4 月 2003(05.04.03)		国际检索报告邮寄日期 08.5月 2003(08.05.03)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451		受权官员  电话号码: 86-10-62093916

C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	WO ,A, 0163241(ZYOMYX) 30.8 月 2001(30.08.01), 全文	1-20
A	WO, A, 0167065(GENOMIC S.A.) 13.9 月 2001(13.09.01), 全文	1-20
A	WO, A, 0138865(THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA) 31.5 月 2001(31.05.01), 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00055

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN, Y, 2386439	05.07.00	无	
CN, A, 1335501	13.02.02	无	
CN, Y, 2473211	23.01.02	无	
WO, A, 0163241	30.08.01	WO, A, 0162887 AU, A, 4326901 AU, A, 3986501 US, A, 2001036674 US, A, 2001036669	30.08.01 03.09.01 03.09.01 01.11.01 01.11.01
WO, A, 0138865	31.05.01	AU, A, 1847701	04.06.01
WO, A, 0167065	13.09.01	FR, A, 2806166	14.09.01